

**Petunia X Hybrida (Bahçe Petunyası) Üzerinde  
Meristem Kültürü Çalışmaları  
Yüksek Lisans Tezi  
Banu Aytül EKMEKÇİ  
BİYOLOJİ  
1992**

**Anadolu Üniversitesi  
Merkez Kütüphane**

# PETUNIA X HYBRIDA (Bahçe Petunyası) ÜZERİNDE MERİSTEM KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

**Banu Aytül EKMEKÇİ**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

**Danışman: Doç.Dr.Süleyman TOKUR**

**1992**

Banu Aytül EKMEKÇİ'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Petunia X Hybrida (Bahçe Petunyası) Üzerinde Meristem Kültürü Çalışmaları" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye: Prof.Dr.Yalçın ŞAHİN

Üye: Doç.Dr.Süleyman TOKUR

Üye: Doç.Dr.Hüseyin MISIRDALI

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun <sup>2</sup>..... gün  
ve ~~31.2.2~~..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Rüstem Kaya  
Enstitü Müdürü

## TEŐEKKÖR

Doku KÖltÖrÖ ĉalıŐmalarımnda değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen BÖlÖm BaŐkanımız Sayın Doç.Dr.SÖleyman TOKUR'a, Dekan Yardımcımız Prof.Dr.Yalçın ŞAHİN baŐta olmak Özere tÖm Biyoloji BÖlÖmÖ Öğretim elemanlarına,ayrıca YÖksek Lisans ĉalıŐmaları için beni teŐfik eden aileme teŐekkÖr ederim.

## ÖZET

Bu çalışmada objemiz Petunia x hybrida bitkisinin aksillar ve apikal tomurcukları üzerinde bitki doku kültürü çalışmalarından, meristem kültürü tekniği uygulanarak virüssüz bitkiler elde edilmiştir. Apikal tomurcuklardan alınan 0,1 mm. büyüklüğündeki eksplantlar in-vitro koşullarda iyi sonuçlar vermiştir.

Meristem kültürü tekniği uygulanan Petunia x hybrida eksplantları gerek serada gerekse dış ortamda yetiştirilen donör bitkilerden alınmışlardır. Serada kontrollü şartlarda bu amaçla yetiştirilen donör bitkilerden alınan eksplantların diğerlerine oranla daha sağlıklı ve kontaminasyonsuz oldukları görülmüştür. Ayrıca genç donör bitkilerden alınan eksplantların yaşlı bitkilerden alınanlara oranla doku kültüründe gelişmelerinin daha iyi olduğu saptanmıştır.

Petunia x hybrida eksplantları KIN (1, 0mg/lit) içeren MS besin ortamında incelenen diğer ortamlara nazaran daha fazla kallus; IAA (1,0 mg/lit) ve BA (0,1 mg/lit) içeren "MS" besiyerinde daha iyi bir vegetatif gelişme sürgün gelişimi; GA<sub>3</sub> (1,0 mg/lit) ve KIN (0,5 mg/lit) içeren MS besiyerinde de en iyi köklenmenin sağlandığı görülmüştür.

## SUMMARY

From the study of the plant tissue culture on the axillary and apical buds of the plant of *Petunia x hybrida* by applying the technique of meristem culture, plants without virus have been found out. The explants of 0,1 mm largeness that have been taken from the apical buds have given good result in in-vitro conditions.

The *Petunia x hybrida* explants, on which meristem culture technique has been applied, have been taken from donor plants that have been grown both in green houses and outside.

It has been seen that the explants that have been taken from donor plants which have been grown for this purpose in green houses in controlled condition are healthier and without contamination.

Besides, it has been fixed that the young explants that have been taken from the young donor plants are better in growing in the tissue culture than those which have been taken from the old ones.

It has been seen that the explants of *Petunia x hybrida* are more callus than the other condition which have been examined in the MS medium which contains KIN (1,0 mg/l) and also it has been seen that they have shown a better vegetative growth, shoot elongation, and in MS medium which contains GA<sub>3</sub> (1,0 mg/l) and KIN (0,5 mg/l) the best rooting has been obtained.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET

SUMMARY

TEŞEKKÜR

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ .....	1
2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI .....	5
2.1. Meristem, Totipotensi, Apomiktik Çoğalma .....	5
2.2. Kallus Oluşumu .....	8
2.3. Meristem Kültürü Fizyolojisi .....	8
2.3.1. Ana Bitkinin Seçimi (Donor Bitki Seçimi) .....	9
2.3.2. Bitkinin Aseptik Şartlarda İzolasyonu .....	10
2.3.3. Besi Ortamlarının Bileşimi .....	12
2.4. Meristem Kültürü Tekniği .....	14
3. MATERYAL VE METODLAR .....	26
3.1. Materyal .....	26
3.2. Metodlar .....	27
3.2.1. Eksplantın Alınması .....	27

3.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması .....	28
3.2.3. Fotoperiyod Uygulaması .....	33
3.2.4. Genç Bitkiciklerin Saksılara Alınmaları .....	33
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>36</b>
4.1. Materyalin Temini .....	36
4.2. Sterilizasyon .....	36
4.3. Besi Ortamları .....	37
<b>5. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>42</b>
<b>6. KAYNAKÇA .....</b>	<b>46</b>

#### **TABLolar, ŞEKİLLER ve RESİMLER**

TABLO 1 .....	31
TABLO 2 .....	32
TABLO 3 .....	34
ŞEKİL 1.....	16
ŞEKİL 2 .....	21
ŞEKİL 3.....	24
ŞEKİL 4 .....	27
RESİM 1.....	26
RESİM 2.....	37
RESİM 3 .....	38
RESİM 4.....	38
RESİM 5 .....	39
RESİM 6.....	40
RESİM 7 .....	40



## 1. GİRİŞ

Günümüzde besin ihtiyacının artması, ormanların azalması, süs bitkilerine olan ilginini artması, bu konudaki biyoteknolojik çalımları da aynı oranda arttırmıştır. Biyoteknoloji, biyolojik bilimlerdeki gelişmelerin teknolojideki gelişmeler yardımı ile uygulamaya konularak kullanılması şeklinde tarif edilebilir. Doku kültürü de biyoteknolojinin bir uğraşı alanıdır.

Doku kültürü tekniği ile kısa sürede bol ve kaliteli ürün elde etmek mümkündür. Ayrıca virüssüz bitki yetiştirmek, uzun süreli muhafaza ve ulaşım kolaylığı, tarla enfeksiyonlarından ve don, dolu gibi benzeri çevre koşullarının olumsuzluğundan etkilenmeyen bitki üretebilmek gibi avantajları vardır.

Doku kültürü ile embriyo , anter, meristem ve hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır.

Alman botanikçisi HEBERLANDT'ın 1902 yılında ilk kez ortaya attığı in-vitro kültür olgusundan yaklaşık 30 yıl sonra doku kültürü tekniği ile bitki WHITE, (1932) tarafından elde edilmiştir. 1960'lı yıllarda ise bu yöntemin bir "Autovegatif üreme metodu" olduğu kabul edilmiştir (ŞİMŞEK, 1989). Doku kültürü tekniğinin ilk uygulandığı çalışma orkidelerin meristem kültürü tekniği ile çoğaltılması olmuştur (MOREL, 1960). Orkide tohumlarının endospermsiz ya da yetersiz endospermli oluşu tohumların çimlenmesini engellemektedir. Bugün birçok ülkede orkideler bu yol ile diğer deşile meristem kültürü tekniği ile üretilmektedir. Ayrıca çok sayıda süs bitkisi, sebzeler, meyva ve orman ağaçları ile bazı tarım bitkileri de bu yöntem ile üretilmektedir.

Bitki doku kültürü çalışmaları içinde en yaygın ve diğer çalışmalara oranla daha iyi sonuç veren meristem kültürüdür. Meristem kültürü çalışmaları; bitki ıslahı ve virüssüz bitki yetiştirilmesi hızlı ve nitelikli bitki üretme gayretinden doğmuştur.

Fransız araştırmacı MOREL'in 1960 yılında bir orkide türü olan Cymbidium sp. üzerinde yapmış olduğu meristem kültürü çalışmaları sonucu elde edilen virüssüz ve hızlı bitki üretimi uğraşları çok değer bulmuş diğer ülkelerde de hızla uygulanmaya başlanmıştır.

In-vitro şartlarda bitki üretimi için çeşitli bileşimlerde hazırlanan besi ortamları ile birlikte fiziksel koşullarda önemli bir faktördür.

Çok sayıda otsu bitkinin meristem kültürü tekniği ile sağlıklı ve güçlü bir kök sistemi oluşturma kapasitesine sahip oldukları saptanmış olup bu olgudan çiçekçilik, seracılık ve fidancılıkta yararlanılmaktadır. Meristem kültüründe; ağaç ve çalı formundaki bitkiler otsu bitkilere nazaran daha yavaş gelişmektedir.

Orman ağaçlarının çoğu generatif olarak, tohumla üretimleri oldukça zordur. Ancak bu bitkileri aksillar (koltuk altı) tomurcuklarla, meristem kültürü çalışmaları ile üretimleri oldukça başarılı olmuştur.

Aksillar tomurcuklar ile yapılan meristem kültürü çalışmalarında, Populus nigra, Eucalyptus sp., Araucaria sp Cryptomeria sp., Syrus sp., Tektona sp., Thuja ağaçları Malus sp., Ribes sp., Rubus sp., gibi meyve bitkileri üzerinde çok olumlu sonuçlar alınmıştır (CREESSWELL ve NITSCH 1975 - GILES ve WHITEHEAT, 1977 - AMOS, 1979 - EVANS, 1981 - GUP-TA, 1981 - KARTHA, 1981).

Karanfil ve soya fasulyesinde "sürgün tipi meristem kültürü" tekniği ile embriyogenesis ve organogenesis çalışmaları başarılı sonuçlar vermiştir (ROEST and BOKELMAN, 1983 - EVANS et al 1981 - KARTHA et al, 1981).

Bitki doku kültürü çalışmaları kapsamında meristem kültürü tekniği ile "hızlı üretim çalışmaları" da yapılabilmektedir. Yeni Zelanda'da Pinus radiata üzerinde yapılan ıslah çalışmalarında meristem kültürü ile yapılan hızlı üretim çalışmaları çok iyi sonuçlar vermiştir.

Bitki kültürlerine 35°C-50°C arasında yüksek ısı uygulamaları ile de virüssüz bitki kültürü eldesi mümkün olmaktadır. Papulus canadensis Moench sürgünleri bu

yöntemle steril edilip meristem kültürü ile virüssüz bitkiler elde edilmiştir (BERBEE, 1977). Doku kültürü teknikleri kullanılarak elde edilen virüssüz kavak fertlerinin, normal kavak fertlerine oranla iki kat daha hızlı büyüdüğü bildirilmiştir (BERBEE, 1977).

Bitki doku kültürü çalışmaları; seçilmiş elit genotiplerin ya da melezlerin vegetatif olarak üretilmesi haploid bitkilerin elde edilip kültüre alınabilmesi, protoplast kaynaştırma yöntemi ile eşersiz melezleme imkanı, değerli genotiplerin derin dondurularak muhafazası ekonomik ve pratik olarak hastalıklara, ağır metallere ve tuzlara karşı dayanıklı genotiplerin seçilmesi ile meristem kültürü tekniği ile virüslerden ve mikroplardan arındırılmış bitkilerin vegetatif olarak üretilmesi gibi sonuçların elde edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca çalışmalar yaygınlaştıkça dünyada son yıllarda baş gösteren ve giderek artan açlık sorunu gibi bir çok sonrunun çözümünde önemli rol oynayacaktır.

Önemi son yıllarda giderek artan meristem kültürü tekniğini konu edindiğimiz bu çalışmada bölümümüzde bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutması amaç edinilmiştir.

## 2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

### 2.1. Meristem, Totipotensi, Apomiktik Çoğalma:

Yüksek bir bitki döllenmiş yumurta hücresinin bölünmesi ile başlayarak bütün yaşam süresince yeni hücreler oluşturur. Yeni organlar meydana getirir. Bu olaylar bitki ölünceye kadar tekrarlanır. Gelişmenin erken embriyonik evrelerinde bütün genç organizmada görülür. Fakat embriyo büyüyüp bağımsız bir bitki halini alınca yeni hücrelerin oluşumu bitkinin belirli kısımlarına bırakılır. Böylece bitkinin belirli bölgelerindeki embriyonik doku bitkinin yaşamı boyunca korunmaktadır. Gelişmiş bir bitki farklılaşmış ve embriyonik dokuların bir karışımı olarak kabul edilir. Sürekli olarak bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerin oluşturduğu embriyonik dokulara "MERİSTEM" adı verilir. Meristem kelime olarak meristos=bölünebilen sözcüğünden türevlenmiştir. Bitkilerde meristematik etkinliklerden oluşan büyüme, organizmanın bütün yaşamı boyunca görülür.

Bitki yapısındaki yerlerine göre meristemler apikal (uç), lateral (enine), interkalar (ara) olmak üzere üçe ayrılır. Apikal meristemler yüksek bitkilerin ana ve yan gövdelerinin, köklerini ve genellikle yaprakların uçlarında bulunurlar. Lateral meristemler bir yönde yüzeye paralel bölünen taslak hücrelerden oluşmuştur. Interkalar meristemler birçok Monokotillerin ve Poaceae'lerin internodyumlarında

ve yaprak kılıflarında görülür. Meristematik hücreler ince çeperli protoplazmaca zengindir. Vakuoller çok küçüktür.

Yalın bir meristematik dokuda karmaşık ve değişken yapılı dokulara aşamalı olarak değişme ve olgun bitki yapısı haline geçme "FARKLILAŞMA" olarak adlandırılır. Diğer bir deyişle özelleşmemiş yapılar özel işleri yapmak üzere değişikliğe uğrarlar. Farklılaşmamış meristematik durumdan farklılaşmış ve gelişmiş duruma geçişte hücrelerin ayrımlı düzenlenişi ve morfolojik özellikleri rol oynar. Sonuçta tek bir hücreden doku ve doku sistemi organ ve gelişmiş bir bitki ortaya çıkar. Farklılaşmada ilkin öncü meristemlerden ayrımlı yapılar oluşturulur. Sonra komşu hücrelerden farklı özellikler kazanılır. Böylece hücre düzeyinde farklılaşma olurken o hücrenin belirli işlevler için öz yapısal özellikleri kazanması gereklidir (YENTÜR, 1984).

Bitkinin gelişmesi ya da ontogenisi arasında büyüme ve hücre farklılaşması ile bitki özel şeklini alır. Bu olaya "MORFOGENEZ" adı verilir. Morfogenez terimi hem bitkinin dış yapısının hem de iç düzenlenmesinin gelişmesi için kullanılır. Böylece farklılaşma ve özelleşme morfogenezin öğeleri olarak sayılmaktadır.

Döllenme esas olarak embriyo kesesinin mikropil tarafında bulunan üç hücreden ortadaki yumurta hücresi ile erkek gametofitin birleşmesi olayıdır. Döllenmiş bir zigot hücresinden gelişmiş olan yarı benzeşik hücre ve dokular aynı genetiksel yeteneğe sahip olmalarına karşın ileri basamaklarda ayrımlı tipte hücre ve dokuları meydana getirirler. Bazı hallerde döllenme olmadan embriyo gelişir. Buna da "APOMİKSİS" denir. Aynı farklılaşma bu şartlarda da geçerlidir. Sonuçta yeni bir bitki oluşur (ÖNDER, 1985).

Doku kültüründe tek bir hücrenin tam bir bitki oluşturma yeteneği hücrelerin gelişme TOTIPOTENSİ'sini göstermektedir. Diğer bir deyişle her hücrenin bir bitkiyi oluşturan tüm özellikleri gizli olarak taşıma olgusuna "TOTIPOTENSİ" adı verilmektedir. Buna göre bütün hücreler "TOTIPOTENT"dir. Çünkü her biri tek bir hücreden yani zigottan kökenlenirler ve genetik olarak aynıdırlar. O halde benzer olan bu totipotent hücreler bitki gelişmesi sırasında yapı ve işlev bakımından nasıl farklı olabilmektedir? Genetik olarak benzer hücrelerin bütün genleri etkindir. Uygun dış etkiler bazı genleri teşvik eder. Diğerlerini bastırır. Sonuç olarak hücreler oluşan etmenlere göre özel olan gelişme yollarını izlerler. Moleküler düzeyde bazı ajanlarla (hormon) belirli genlerin etkinliği hücrenin farklılaşma yolunu belirleyen özel enzimlerin sentezine yol açmaktadır.

Bitki morfogeneğinde tüm düzenleyici mekanizmanın varlığını gösteren bir olay da "POLARİTE"dir. Yani bitkinin iki ucu arasında ya da bireysel organlar arasında fizyolojik ve yapısal ayrımlar oluşmaktadır. Polarite farklılaşmayı ve farklılaşmanın ortaya çıkışını kontrol eden bir etkidir.

Sonuç olarak ortam; hücrenin genetik yapısını etkileyerek hücre içi olayların ve koşulların hazırlanmasını sağlamaktadır. Bu koşullarda hücrenin kalıtsal durumu ön plana alınarak büyüme, gelişme, farklılaşma ve davranışların ortaya çıkmasına neden olur (YENTÜR, 1984).

Meristem kültürü tekniği de bitkiden alınan küçük bir meristem hücreleri topluluğundan (eksplant) uygun şartlarda uygun besiyerle ve hormonlarla yeni bir bitki elde edilmesidir.

## 2.2. Kallus Oluşumu

Meristem kültüründe alınan ekplantlar bitkiden ayrılırken eksplant üzerinde yaralar oluşur. Bu yaralar daha sonra uygun ortamlarda kallus oluştururlar.

Gymnosperm ve dikotil bitkilerde adventif kök primordiyumu, daha çok floem bölgesindeki parenkima veya kallusdur.

Bitkiler kesik yüzeyler üzerinde diğer deyişle yara yüzeyleri üzerinde kök oluşturma yetenekleri bakımından birbirinden farklıdır.

Yaralanma sonucu oluşan kesik yüzeylerde kallus oluşması ile adventif kökler meydana gelir. Bunlara yara kökleri denir. Aynı şekilde meristem kültüründe de kesik yüzeylerde kallus oluşmasıyla adventif kökler meydana gelir.

Adventif kökler (ek kökler) bitkilerin vegetatif olarak üremesine yardımcı olur. Bunlar çelik ve aşu ile üretmenin ayrıca doku kültürlerinin temelini oluştururlar (YENTÜR, 1984).

## 2.3. Meristem Kültürü Fizyolojisi

Meristem kültürü; ana bitkinin meristemdeki hücre yığına verdiği tüm besin maddelerinin suni yolla sağlama tekniğinin adı veya ortamıdır. Dolayısı ile meristem



kültürünün esası; meristemin uygun şartlarda birkaç yaprak taslağı ile ana bitkiden izole edilerek uygun besi ortamında büyütülmesidir.

Meristem kültürü çalışmalarında üç temel öge vardır.

1. Meristemin alınacağı ana bitki (Donor bitki).
2. Meristemin aseptik şartlarda izolasyonu.
3. Meristemin büyümesini sağlayacak besi ortamları.

### 2.3.1. Ana Bitkinin Seçimi (Donor Bitki Seçimi)

Ana bitkinin seçiminde ilk olarak hangi meristem türünün uygulanacağını tesbit etmek gerekmektedir. Daha sonra çeşidimize uygun olan, bitkinin fizyolojik yaşının bilinmesi önemli bir faktördür. Örneğin, genç bitkilerden kök meristemi, yaşlı bitkilerden de sürgün meristemi almak daha uygundur.

Meristemin alındığı mevsim de oldukça önemlidir. Bitkilerin mevsimsel olarak fizyolojik özellikleri, reaksiyonları farklı olmaktadır. Örneğin, *Solanum sp.*, meristem kültürü için en uygun mevsimin Aralık-Nisan ayları olduğu saptanmıştır. Bitkinin yaprak verdiği ilk aylar olan Mart-Nisan ayları en uygun olan zamandır (HU ve WANG, 1985).

Bunların yanında ana bitkinin kalitesi, sağlıklı olması, büyüme başlangıcında olması, dormansisiz olması da önemlidir.

Ayrıca ana bitkinin toprağının gübreliliği veya gübresiz olması da önemlidir. Bu toprağın gübreliliği veya gübresiz olması meristemin alındığı bölgeye ve bitki çeşidine göre değişmektedir.

Ana bitkinin dış ortamda hava ve çevre ile ilişkide olması kontaminasyon olayını artırır. Bu nedenle donör bitkilerin mutlaka çevre koşullarından kısmen uzakta olan bu amaçla kurulmuş özel seralarda yetiştirilmeleri gerekmektedir.

### **2.3.2. Bitkinin Aseptik Şartlarda İzolasyonu**

Besi ortamlarının sterilizasyonu otoklavla sağlanmaktadır. Genelde otoklavda tutma süresi 15 dakika, otoklavın sıcaklığı 120°C, basıncı 15 Lb olmalıdır. Ancak süre otoklavlanan materyalin hacmine göre değişmektedir.

Sterilizasyon için otoklavlanan materyalin içinde, ısıdan dolayı özelliğini kaybedecek olan hormonlar gibi kimyasallar otoklavlanmazlar. Bu gibi maddeler otoklavdan çıkarılan materyalin ısısı 40°C'ye düştüğünde besi ortamına steril filtreler yardımı ile (ø:0,45 mm) enjekte edilirler.

Otoklavlanan materyali herhangi bir bulaşmadan korumak için materyalin bulunduğu kapların ağzı pamuk veya alüminyum foille kapatılır. Ancak steril kabin içinde ağzı açılır.

Kullanılan malzeme genellikle besin ortamı ile sterilize edilebildiği gibi, 160-180°C'de 3 saat süre ile kuru havalı fırınlarda da sterilize edilebilmektedir.

Ayrıca bazı malzemelerde % 96 etanole batırılıp alevden geçirilerek steril edilebilmektedir.

Genelde bitkilerin dış yüzeyleri mikrobik bulaşmaya açıktır. Kontaminasyonu önlemek için bitkinin yüzey sterilizasyonuna tutmak gerekmektedir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan madde hipoklorat (Na veya Ca) solusyonlarıdır. Bu solusyonlar % 0,3-0,6 yoğunlukta ve 15-30 dakika süre ile tatbik edilir. Bunun yanında etil alkol veya izopropil alkol de dezenfektan olarak da kullanılabilir.

Uygulamada; sürgünlerin üzerinde meristemin bulunduğu kısım altından kesilir. Kesilen bu parçalar %0,3-0,6'lık hipokloratlı (Na, Ca) ortamda manyetik bir karıştırıcı ile 15-30 dakika süre ile karıştırılır. Buradan alınan parçalar steril kabin içinde yine steril üç ayrı saf su kabında tekrar belli sürelerde (10 dakika) bekletilir.

Steril kabin içinde, kaplarından çıkarılan materyal yine daha önce UV lambaları ile steril edilmiş mikroskop altında steril pens ve bistüriler yardımı ile istenilen büyüklükte meristemin izolesi işlemine başlanır. İzole edilen meristem steril kabin içinde besi ortamına aktarılır. Her meristem operasyonu sonucu kullanılan bıçak alkolle yıkanıp alevden geçirilmelidir. Gıda ortamındaki meristemlerin gelişmesi için 24°C sıcaklıktaki etüve aktarılır. Laminar hava akımı üfleyen steril kabin çalıştırdıktan 10-15 dakika sonra kullanılmalıdır.

### 2.3.3. Besi Ortamlarının Bileşimi

Bitki doku kültürü çalışmalarında besi ortamında su, organik ve inorganik bileşikler bulunmaktadır. Kimyasal maddelerin farklı miktarlarda kullanılarak uygulayıcıların adları ile anılan çok sayıda besi ortamı bileşimi bulunmaktadır. Örneğin, , HILDEBRANDT (1946), BURKHOLDER ve NICHELL (1949), NITSCH (1951), HELLER (1953), REINERT ve WHITE (1956), MURASHIYE ve SKOOG (1962), WHITE (1963), GAMBORG (1968), SCHENK ve HILDEBRANT (1972) besiyerleri.

Meristem kültüründe en çok kullanılan besi ortamı "MS" ile ifade edilen MURASHIGE ve SKOOG (1962) kullandıkları besi ortamıdır. Besi ortamının % 97'sini su oluşturmaktadır. Kullanılan suyun saf su olması gerekmektedir.

Besi ortamında enerji kaynağı olarak % 2-3 oranında şeker kullanılmaktadır. En fazla kullanılan şeker formu sakkarozdur. Laktoz, maltoz, galaktoz ve nişasta ile yapılan çalışmalar olumlu sonuç vermemiştir

Besi ortamına bitkiler tarafından sentezlenemeyen bazı vitaminlerin de ilave edilmesi gerekmektedir.

Bir kısmı doğal bir kısmı da sentetik olarak elde edilen hormonların da besi ortamında bitki çoğaltmada büyük önemleri vardır. Bunlar oksinler, sitokininler, gibberellinlerdir.

Oksin grubu bileşikleri; genelde hücre bölünmesi ve kök farklılaşmasına neden olurlar. Örneğin, IBA (Indole 3 butirik asit), NAA (Naftalen astik asit).

Stokinin grubu bileşikler; hücre bölünmesi ve sürgün farklılaşması için kullanılırlar. BAP=BA (6 benzil amino purin), IPA (İzopentenil adenozin) bu gruba iki örnektir.

Besi ortamına doğal bileşikler olarak da hindistan cevizi, mısır endospermeleri, muz, portakal, domates püresi ve suları, malt, bira mayası ve balık yağı gibi maddeler eklenebilir. Ancak son yıllarda bileşimleri çok karışık olan bu doğal besin maddelerini bitki doku kültürlerinde besiyerlerine katılmalarından vazgeçilmiştir.

Eğer katı gıda ortamında çalışılacaksa ortama % 0,8-1 oranında agar ilave edilir.

Değişik bileşiklerden oluşan besi ortamı miktarı kullanılacağı kadar hazırlanabileceği gibi stok solusyon olarak da hazırlanabilir. Buzdolabında 4°C sıcaklıkta belli bir süre bekletilebilir. Ancak, stok solusyonlar birbirini menfi yönde etkilemeyecek şekilde ayrı gruplar halinde hazırlanmalıdır.

Besi ortamının PH'sı genelde 5,5-6 olmalıdır ve bu NaOH veya 1 N HCL ile sağlanmaktadır.

#### 2.4. Meristem Kültürü Tekniği

Meristem kültürü çalışmaları üç aşamada gerçekleştirilmektedir.

1. Eksplantın alınması,
2. Üretim,
3. Köklendirme.

Kuşkusuz bu aşamalara, elde edilen bitkilerin aşamalı olarak normal koşullara adaptasyonu ve pratiğe aktarılması çalışmalarını da eklemek gerekmektedir.

Ancak eksplantın alınması ve köklendirilmeleri bitkiden bitkiye, hatta aynı bitkinin farklı organlarının kullanılmasına, bitkinin fizyolojik durumuna bağlı olarak değişmektedir. Meristem kültürü çalışmalarında eksplant çoğunlukla aktif ve dormant yan tomurcuklardan, apikal tomurcuklardan ya da köklerden alınmaktadır. Alınan eksplantlar değişik araştırmacıların adları ile anılan bileşimleri temel olarak hemen hemen aynı ancak bazı maddelerde farklılıkları olan besi ortamlarında geliştirilip üretilmektedirler. Bu besi ortamları sıvı ya da katı halde olabilmektedirler. En yaygın olarak kullanılan besi ortamları olan "Katı MS Besi Ortamı" MURASHIGE ve SKOOG (1962), "Katı veya Sıvı LS Besi Ortamı" LINSMAIER ve SKOOG (1965), tarafından ilk kez kullanılan besi ortamlarıdır. Eksplantların regenerasyonundan vegetatif gelişiminden sonra kuşkusuz köklendirilmeleri gelmektedir. Bu olguda titizlik, bilgi ve deneyim istemektedir. Köklenme için de çeşitli hormonlardan yararlanılmaktadır. Vegetatif gelişmiş eksplantların köklenmeleri için köklenmeyi teşvik eden hormonlara ek olarak eksplantlara fotoperyot uygulaması da

gerekmektedir.

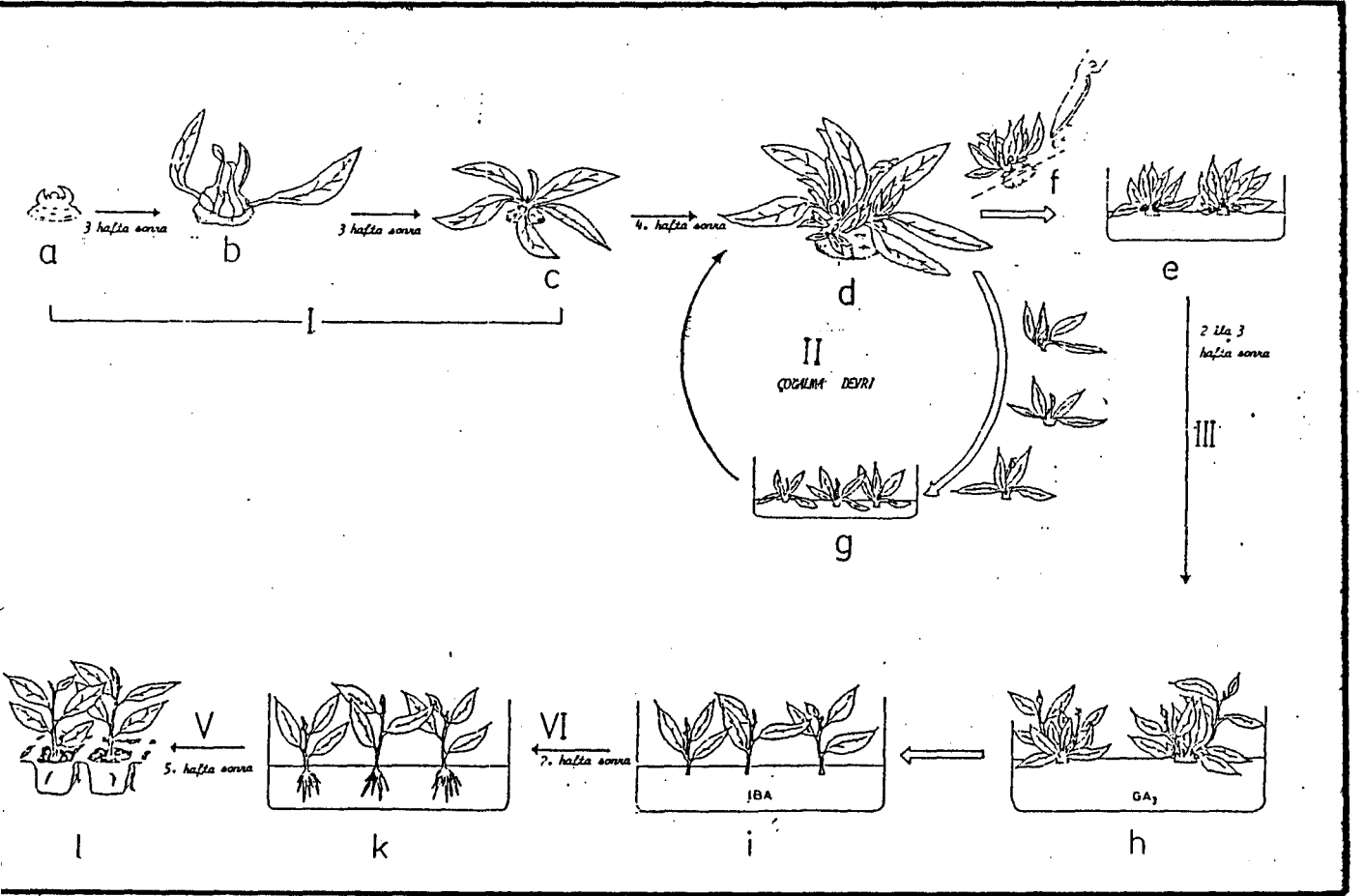
Elma ağacında yan tomurcuk çiftlerinden aktif ve dormant sürgünler alınır. Bu eksplantlar alındıktan sonra her bir tomurcuk nodlara ayrılır. Sonra etil alkolle ve Ca (ClO<sub>2</sub>) ile steril edilir Steril saf suda çalkalanır. Sonra steril edilmiş bistüri ve pensle her eksplantta bir nod kalacak büyüklükte kesilir. Alınan eksplantlar bitki doku kültürü yöntemi ile üretilir (BROOME ve ZIMMERMAN, 1980c).

Cerasus avium(kiraz) un meristem kültürü tekniği ile in-vitro şartlarda üretimi beş aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 1).

1. Eksplantın alınımı ve geliştirilmesi
2. Çoğalma periyodu
3. Sürgünlerin geliştirilmesi
4. Köklendirme
5. Ortama adaptasyon

#### 1. Eksplantın Alınımı ve Geliştirilmesi:

Eksplantlar kiraz ağacının aksillar tomurcuklarından alınmıştır(Şekil 1.a). Üç hafta sonra kallus oluşumu ve yaprak gelişimi görülmüştür(Şekil 1.b). Altı hafta sonra tüm yaprak taslakları açılmış ve bitkicik rozet benzeri bir hal almıştır(Şekil 1.c).



Şekil I: *Cerasus avium* (L) Moench in vitro üretimi

I: Eksplantın alınımı, geliştirilmesi (a: Aksillar tomurcuktan alınan eksplant, b: Yaprak gelişiminin başlangıcı, c: Rozet benzeri sürgün.

II: Çoğalma periyodu (d: Çok sayıda koltuk altı sürgünlü gövde demeti, e: Çoğalma besi ortamı, f: Tabandaki kallus partiküllerinin uzaklaştırılması.)

III: Sürgünlerin geliştirilmesi (g: Sürgün geliştirici besiyeri, h: Bitki geliştirici besi ortamı, i: Köklendirme besi ortamı.

IV: Köklendirme (k: In-vitro şartlarda köklenmiş mikro kesimler.)

V: Ortama adaptasyon, l: Sera şartları için iklime alıştırmış turbalı saksılardaki bitkicikler

(A.MEIER DINKEL ve B. UNGELENK 1985'den değiştirilmiştir).



## 2. Çoğalma Peryodu:

On hafta sonra eksplantlardan çok sayıda koltuk altı sürgünlü gövde demeti meydana gelmiştir(şekil 1.d). Oluşan sürgün demetleri tek tek ayrılmıştır. Tek tek ayrılan sürgünler IBA ve BA'lı çoğalma besi ortamına alınmıştır(şekil 1.g). Böylece bir eksplanttan çok sayıda bitkicik elde edilmiştir. Sonra oluşan bitkiciklerin alt kısımlarındaki kalluslar kesilerek uzaklaştırılmıştır(şekil 1.f).

## 3. Sürgünlerin Geliştirilmesi:

Bitkiciklerden kalluslar uzaklaştırıldıktan sonra bitkicikler geliştirme besi ortamına aktarılmıştır(şekil 1.e). Buradan da 2-3 hafta sonra GA<sub>3</sub>'l besi ortamına diğer deyişle bitki geliştirici besi ortamına alınmışlardır(şekil 1.h). Gelişen bitkilerde oluşan sürgünler mikro kesimler yapılarak IBA'lı besi ortamına ekilmişlerdir(şekil 1.i).

## 4. Köklendirme:

Mikro kesimler IBA'lı köklendirme besiyerinde iki hafta sonra kklenmişlerdir(şekil 1.k).

## 5. Ortama Adaptasyon:

Yedi hafta süre ile köklendirme besi ortamında tutulan sürgünler burada yeteri kadar kök ve toprak üstü organları geliştikten sonra içinde turba yosunu da içeren

saksılara alınmışlardır(Şekil 1.I). Saksılanan bu bitkiciklerin önce sera daha sonra dış koşullara adaptasyonu sağlanmaktadır.

Çilek bitkisinden alınan meristem eksplantları köklerden alınır. En son oluşmuş yeni köklerden kök uçları alınır. Alınan kökler yıkanır. Sonra kurutma kağıdında kurulanır. Alınan bu kök uçları NaCl ile steril edilir. kurutma kağıdı ile kurulanır. Sonra steril pensle ekim yapılarak doku kültürü yöntemi ile üretilir (BROOME ve ZIMMERMAN, 1980 a,b).

Orkidelerden Catasetum trulla Lindl elde edilmesi için de kök ucundan eksplantlar alınmıştır. Alınan eksplantlar 1,5 mm. büyüklüğündedir. Bu eksplantlar ince parçalara ayrılarak jel kültür ortamına aktarılır (KERBOUY, 1984). Sonra bu eksplantlardan 6-7 cm. yüksekliğinde bitkiler elde edilir.

Otsu bir bitki olan Solanum tuberosum da meristem kültürü ile bitki elde etmek için tuber içinden yaklaşık 20 gr'lık tuber parçaları 1 saat süre ile 0,3 gr/lit GA içinde yıkanır. Filizlenen tuber parçaları nemli steril odalara alınır. Bu odalarda gelişen apikal tomurcuk meristemi yaklaşık 1 mm. büyüklüğünde alınır (HU ve WANG, 1985).

Ağaç üzerinden eksplant alınırken önce eksplant alınacak beş yaşındaki bitkiler seçilir. Bu ağaçların tomurcukları üzerine antibiyotik ve sistemik fungusid uygulanır. Bu karışım: % 0,1 streptomisin +0,1 bennat dan ibarettir. Başka bileşiklerde de hazırlanabilir. Bu karışım seçilen ağaç üzerine haftada bir defa olmak üzere dört hafta süre ile sürgün uçlarına spreylenebilir. Dördüncü spreiden sonra sürgün uçları yaklaşık 5 cm. büyüklüğe ulaşır. 5 cm. büyüklüğe ulaşan sürgün uçları kesilir. Yani 15-20 adet apikal uç (Apikal kubbe) sürgün uçlarından kesilip ayrılır. Eksplantlar önce %

75 etil alkol içine 2-3 defa daldırılıp çıkarılır. Daha sonra da saf su ile bir defa çalkalanır (HU, 1979 -HU ve WANG, 1980).

Bir orkide türü olan Catasetum trulla'nın üretiminde değiştirilmiş KNUDSON (1946) besi ortamı kullanılmıştır. Bu besiyerine 27,8 mg Fe EDTA (MURASHIGE ve SKOOG, 1962) eklenmiştir.

Solanum tuberosum'un üretiminin ilk aşamasında meristem eksplantları üzerine 1 gr bacto tripton dökülmüş katı MS besiyerine ekilir. Besiyer 15 X19 mm'lik kültür tüplerine konulmuştur. Üretim ortamı 25°C sıcaklıkta olmalıdır. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olmak üzere fotoperyot uygulanmalıdır. Birinci hafta ışık uygulamasında 150 lüks şiddetinde ışık, ikinci hafta 500 lüks şiddetinde ışık kullanılmalıdır. Bitkilerin kökleri iki hafta içinde 3 cm. uzunluğa ulaşır.

İkinci aşamada dar boyunlu ince şişelere 0,05 mg NAA "MS" besi ortamına ilave edilerek dökülür. Kökleri 3 cm. uzunluğa ulaşmış eksplantlar buraya transfer edilir. Yirmi gün içinde bitkide bir gelişim olur.

Son aşamada aksillar sürgünler 22,0-44,0 mg BA ve 0,23 gr sukroz eklenmiş "MS" besiyerine ekilir. Bu besiyerler 300 veya 500 ml'lik dar boyunlu ince tüplere konmuştur. Ekilen bu sürgünlerin üretimi için 8 saat aydınlık, 16 saat karanlık olmak üzere fotoperyot uygulanmalıdır. 100-500 lüks'lük ışık kullanılmalıdır. Ayrıca sıcaklık da 18-20°C olmalıdır. Dört hafta sonra ürünler gelişebilir (HU ve WANG, 1985).

Orman ağaçları üretiminde LS gıda ortamı kullanılır. Bu besiyer 250 ml'lik dar boyunlu şişelere alınır. 1 cm. uzunluğa ulaşan sürgünlerin gıda ortamı 25,0 mg IBA

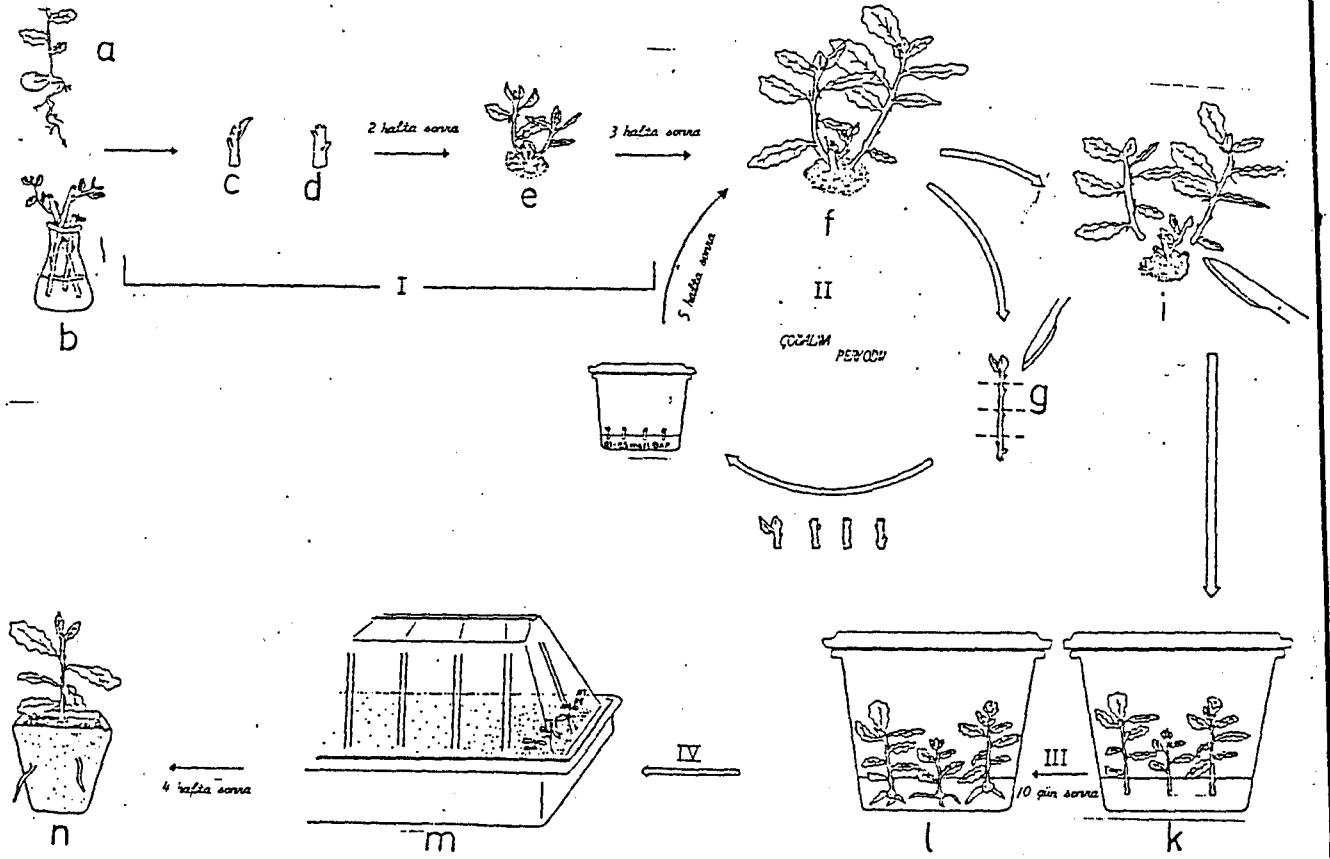
ilave edilmiş LS besiyeridir. Onbeş ila kırkbeş gün sonra tek tük köklenme görülür. Quercus robur ve Q.petraea'nın meristem kültürü tekniği ile in-vitro şartlarda üretimi dört aşamada gerçekleştirilmiştir (Şekil 2).

1. Eksplantın alınması ve geliştirilmesi
2. Çoğalma periyodu
3. Köklendirme
4. Ortama adaptasyon

1. Eksplantın alınması ve geliştirilmesi:

Bu çalışmada eksplantlar iki yolla temin edilmişlerdir. Bunların ilkinde meşe ağacı tohumları toprağa ekilerek çimlendirilmiştir(Şekil 2.a) .Tohumdan gelişen fideciğin apikal ucu alınmıştır(Şekil 2.c).

Eksplantın temininde ikinci yol ise gelişmiş meşe ağaçlarından diğer bir deyişle donör bitkilerden alınan genç dal parçalarından eksplantların alınmasıdır(Şekil 2.b). Alınan bu genç dal parçaları üzerindeki sürgünler kesilip atılır. Sürgün iki lateral tomurcuğu eksplanta kalacak şekilde kesilir(Şekil 2.d).



Şekil II: *Quercus robur* ve *Q. petraea*'nin in-vitro üretimi

I: Eksplantın alınışı ve gelişimi (a: Fedicik, b: Donor bitkiden alınan sürgünler, c: Fidecikten alınan apeks, d: Donor bitkiden alınan yaprak tomurcuklu bir segment, e: Gelişen sürgün tomurcukları);

II: Çoğalma periyodu (f: Koltuk altı tomurcukların gelişmesi, g: Sürgün üzerindeki 8 mm. uzunluğundaki nodal segmentlerin alınması, h: Geliştirme besi ortamı, i: Koltuk altı tomurcuklardan gelişen sürgünlerin alınması).

III: Köklendirme (k: Sürgünlerin köklendirme besi ortamına alınmaları, l: Köklendirme besi ortamında kökleşen sürgünler).

IV: Köklü bitkiciklerin toprağa alınıp ortama adaptasyonları (m: Köklü bitkiciklerin toprağa alınması, n: Bitkilerin saksılara alınmaları).

(A. MEIER DINKEL ve UNGELENK, 1985'den değiştirilmiştir).

Gerek tohum çimlendirilmesi ile gerekse gelişmiş donör bitkilerden alınan eksplantlar BA'lı (1,0 mg/lit) GD geliştirme besi ortamına alınmışlardır (GD:GRESSHOFF ve DOY, 1972).

Bu besi ortamında eksplantlardan iki hafta sonra sürgünler gelişmiştir(Şekil 2.e).

## 2. Çoğalma periyodu:

Üç hafta süre ile gelişen sürgünler kesilmiş yaprakları uzaklaştırılmış ve koltuk altı tomurcuklara sahip sürgün 8 mm. büyüklüğünde nodal segmentlere bölünmüştür(Şekil 2.g). Bu segmentler BA'lı (0,1-0,5 mg/lit) GD geliştirme ortamına inoküle edilmişlerdir(Şekil 2.h). Bu inoküle edilen eksplantlardan beş hafta sonra bol koltuk altı tomurcuklara sahip sürgünler elde edilmiştir(Şekil 2.f). Böylece çoğaltılan sürgünler kesilerek köklendirme besi ortamına aktarılmıştır(Şekil 2.i).

## 3. Köklendirme:

Eksplantların koltuk altı tomurcuklarından gelişen bu sürgünler 1/3 oranında MS besin ortamına alınmışlardır(Şekil 2.k).

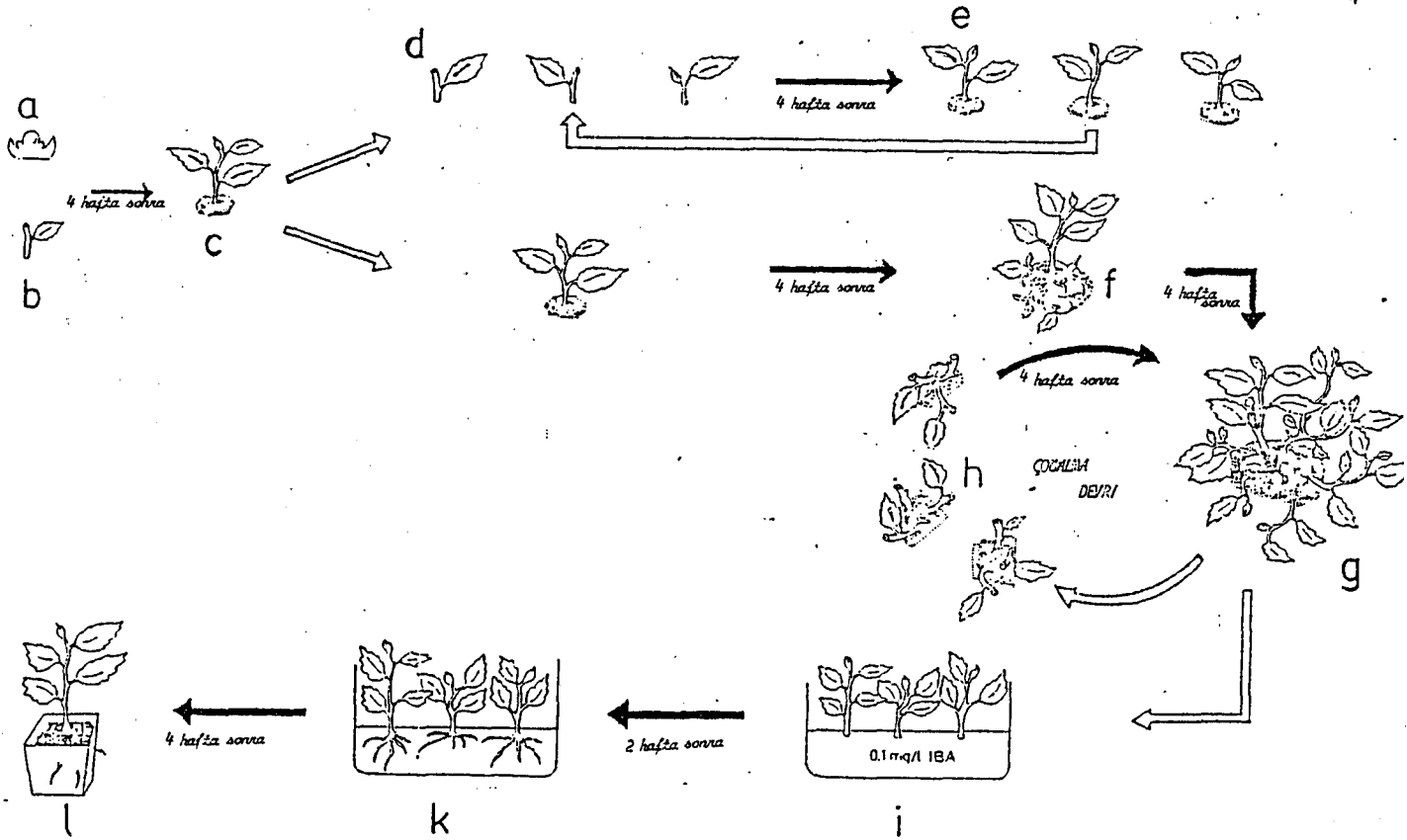
Sürgünler bu köklendirme besin ortamında 10 gün sonra köklenmişlerdir.(Şekil 2.l).

#### 4. Ortama adaptasyon:

Köklendirilmiş bitkicikler saksılara aktarılmadan ortama yavaş yavaş alıştırmaları için önce dört hafta süre ile bir cam faunus içine yüksek nemli bir ortamda toprağa ekilmişlerdir(Şekil 2.m). Dört hafta sonra ise bitkiler buradan saksılara aktarılmışlardır(Şekil 2.n).

Orman ağaçlarından Betula pubescens ve B. pendula'nın in-vitro üretiminde (Şekil 3) ise tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen fideciklerin aksillar tomurcukları(Şekil 3.a) ile in-vitro kültürde gelişmesi sağlanan aksillar tomurcukları (Şekil 3.b), nodal segmentler eksplant olarak alınmışlardır. Bu eksplantlar in-vitro koşullarda dört hafta sonra birkaç yapraklı kallusa benzer bir yapıya sahip gelişme göstermişlerdir(Şekil 3.c). Bu sürgünler nodal parçalara ayrılarak besiyerine ekilmişlerdir (Şekil 3.d,e). Besi ortamında dört hafta sonra yine birkaç yapraklı ve kalluslu sürgünler gelişmiştir (Şekil 3.f).Bu sürgünler taze hazırlanmış beriyerine aktarılmışlardır. Sürgünler besiyerinde dört hafta sonunda daha gelişmiş ve çoğalmış hale gelirler(Şekil 3.g). Buna çoğalma periyodu adı verilir. Dört hafta sonra ise çoğalıp gelişen sürgünler kesilerek köklendirme besi ortamına alınmışlardır(Şekil 3.i). Köklendirme besi ortamında 0,1 mg IBA'da bulunmaktadır.

Köklendirme besi ortamına alınan sürgünlerin dışındaki yapı ise birkaç parçaya ayrılarak tekrar çoğalma amacıyla taze besi ortamına aktarılırlar(Şekil 3.h).



Şekil III: *Betula pubescens* ve *B. pendula*'nın in-vitro üretimi

(a: Aksilları tomurcuktan alınan eksplant, b: In-vitro kültürden alınan nodal segment, c: Kallusa benzer dokulu sürgün, d: Sürgünün kallusa benzer dokusu uzaklaştırılır. Sürgün nodal parçalara ayrılır. Nodal parçalar ve sürgün ucu taze hazırlanmış besiyerine ekilirler. e: Sürgün kallusa benzer dokulu sürgün taze besiyerine transfer edilir, f: Dallanmamış, kaidelerinde kallus oluşmuş uç ve koltuk altı sürgünleri.

A: Çoğalma periyodu (g: Bol sürgün vermiş gelişmiş bir eksplant, h: Lateral yaprak tomurcuklarına sahip, geliştirme besin ortamına alınacak kalluslu eksplant parçaları).

B: Gelişmiş ek sürgünlerin köklendirme besin ortamına transfer edilmeleri, (i: Köklendirme besiyerine alınmış sürgünler, k: Köklenmiş sürgünler, l: Saksılanmış bir bitki). (A. MEIER, DINKEL, B.UNGELNİK, 1985'den değiştirilmiştir).



IBA'lı köklendirme besin ortamına alınan sürgünler burada iki hafta içinde köklenirler(Şekil 3.k). Dört hafta sonra ise içinde turba yosunu da bulunan saksılara alınıp önce sera koşullarına daha sonra da dış mekanlara alıştırılırlar(Şekil 3.l).

Bu çalışmada yüksek üretim hızı, sürgün kaidelerinde ek sürgün oluşumunun meydana gelmesi, kallusa benzer dokunun kültürü ile elde edilmiştir.

Meristem kültürü çalışmalarının diğer doku kültürü çalışmalarına nazaran bir diğer farklılığı da virüs konsantrasyonunun diğer hücrelere karşı daha düşük olmasıdır.

Virüs yoğunluğu meristem hücreleri ne kadar genç ise o kadar düşük ne kadar yaşlı ise o kadar fazladır. Virüsler bitkilerde vasküler sistemde (iletim demetlerinde) hızlı hareket etmektedirler. Meristem dokusunda hele hele genç meristem hücrelerinin bulunduğu evrelerde dokuda iletim demetleri tam olgunlaşmamıştır. Dolayısıyla genç meristem hücrelerinin yaşlı diğer deyişle virüsler ile kontamine olmuş hücrelerle teması gecikmektedir.

İletim sisteminin tam gelişmemesi dolayısı ile virüslerin hücreden hücreye hareketlerinin yavaş olmasına ancak aktif olarak bölünen meristem hücrelerinin içindeki metabolik aktivitenin hızlı olması meristem hücrelerinde virüs konsantrasyonunun düşük olmasına neden olmaktadır. Tüm bu nedenlerle meristem kültürü çok sayıda amaç yanında virüssüz bitki yetiştirmede de son derece başarılı sonuçlar vermiştir.

### 3. MATERYAL VE METODLAR

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada ele alınan materyal *Solanaceae* familyasından *Petunia x hybrida* (Bahçe petunyası) dır. Araştırma bitkisi tek yıllık, otsu, pubescent tüylü yapraklar ve yukarıya yönelmiş olan, iri, beyaz, pembe, kırmızı, mavi, mor renkte çiçeklere sahip dekoratif bir bitkidir. *Petunia axillaris* B.S.P. ile *P. violacea* Lindl arasındaki yapılan çaprazlamalar sonunda elde edilmiş bir hibrididir.

Araştırma materyali olan bitkiler üniversitemizin Yunus Emre Kampüsü bahçesinden ve serasından temin edilmiştir (Resim 1).



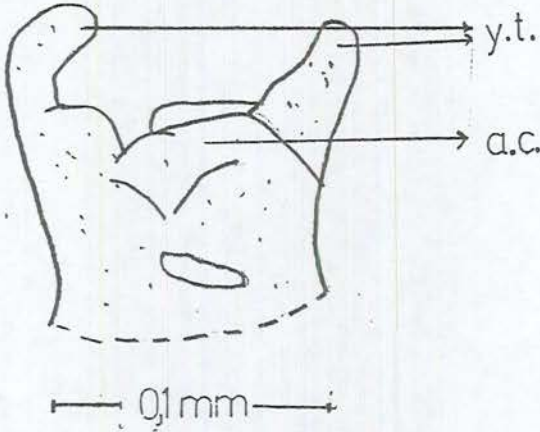
Resim 1. *Petunia x hybrida*'nın genel görünüşü

### 3.2. Metodlar

#### 3.2.1. Eksplantın Alınması

Nisan-Mayıs aylarında hızlı gelişim içinde olan sağlıklı ve dormansisiz bitkilerden eksplantlar alınmıştır.

Eksplantlar apikal ve aksillar tomurcuklardan alınmıştır(Şekil 4).



ŞekilIV. Alınan eksplantın mikroskopik görünümü

a.ç:Apikal uç y.t: Yaprak taslakları

Ana bitkiden alınan eksplantların dış yüzeyleri mikroskopik bulaşmaya açıktır. Bunu ortadan kaldırmak için eksplantların yüzeyi steril edilmektedir. Eksplantlar % 0,3-0,6'lık hipokloratlar (Na veya Ca) içine alınır ve miknatıslı bir karıştırıcı ile 15-30 dakika karıştırılır.

Eksplantlar daha sonra steril kabin içindeki içinde steril saf su bulunan üç ayrı behere alınır. Bu beherlerin her birinde eksplantlar 10 dakika bekletilir. Böylece yıkanmış olur.

Eksplantlar steril edildikten sonra yine 2600-2700 A<sup>0</sup> dalga boyunda UV lambaları ile steril edilmiş kabin içindeki binoküler stereo mikroskop altında uygun büyüklükte, 0,1 ,mm kesilir. Bu işlem yapılırken pens ve bistüriler her eksplant alınışında alkole batırılıp alevde yakılarak sterilize edilmektedir.

Steril koşullarda alınan eksplantlar içinde steril saf su bulunan petrilere biriktirilerek daha sonra yine aynı koşullarda besiyerine inoküle edilmişlerdir. Ayrıca eksplantlar alınır alınmaz doğrudan doğruya besiyerlerine inoküle edilmişlerdir. İçinde besi ortamı bulunan ve eksplant inoküle edilen petrilere, deney tüpleri ve kavanozlar inokülasyondan sonra üzerlerine gerekli bilgiler yazılıp, gerekli notlar alınır. Dışarıdan gelebilecek kontaminasyon olasılığını engellemek için petrilere çevresi parafilm ile çevrilir.

### 3.2.2 Besin Ortamlarının Hazırlanması

Bu meristem kültürü çalışmalarında temel olarak "MS" besiyeri kullanılmıştır.

Kallus oluşumu için "MS" stok solusyonuna (Tablo 1) 1,0 mg/lt KIN (Kinetin) eklenerek kullanılmıştır. Aynı şekilde bitkinin boyunun uzaması ve yapraklarının gelişmesi için MS (Tablo 2) besiyerine 1,0 mg/lt IAA (Indol asetik asit) ve 0,1 mg/lt BAP=BA (6 benzil anino pürin) hormonları eklenmiştir.

Boyu uzayıp yaprakları geliştikten sonra köklendirmek için KIN (0,5 mg/lit) ve GA<sub>3</sub> (1,0 mg/lit) hormonları MS (Tablo 2) besiyerlerine eklenmiştir.(GA<sub>3</sub> = Tri gliser aldehit).

Bu besiyerler her safhada bitkinin transferi ile kullanılmıştır.

Besin ortamlarının sterilizasyonu otoklavda sağlanmıştır. Ancak bu amaçla kuru havalı fırınlardan da yararlanılmaktadır. Otoklavda 15 dakika süre ile 120°C'de 15 Lb basınç altında sterilizasyon sağlanmaktadır.

Besin ortamlarına katılacak hormonlar otoklavlanmadan ötürü özelliklerini yitirecekleri için önce besin ortamlarına katılmamışlar, diğer elementler otoklavlandıktan ve ısı 40°C'ye düştükten sonra 0,45 mm'lik steril filtreler yardımı ile enjekte edilmişlerdir.

Otoklavlanan materyallerin herhangi bir kontaminasyondan korunması için kapların ağızları ya da tümü aliminyum foil ile veya steril pamuk ile kapatılmıştır.

Kuru havalı fırınlarda sterilizasyon için ise materyal 160-180°C'de 3 saat tutulmuştur.

Besin ortamlarının döküleceği petripler (70-90 mm) deney tüpleri (12 x 190 mm, 20 x 220 mm), farklı büyüklüklerde cam şişeler, cam kavanozlarda aynen besiyer ortamları gibi steril edilmişlerdir.

Sterilize edilmiş hormonlar eklenmiş besi ortamları yeteri kadar soğuktan sonra, elle tutulabilecek duruma gelince, steril kabin içinde petrilere, deney tüplerine ya da kavanozlara dökülür. Deney tüpleri ile kavanozlara belli bir eğimle dökülmek suretiyle ekim yüzeyi arttırılır. Soğumaya bırakılır. Deney tüplerinin, petrilere, cam kavanozların içinde bulunan besi ortamlarının bileşimi, hazırlanış tarihi daha sonra inokülasyon tarihi materyal vb. bilgiler protokol defterine kaydedilir.

Regeneratların bir besi ortamından diğerine aktarılması yine steril kabin içerisinde yapılmıştır.

Bu esnada tüplerin ve kavanozların ağızları yanan bekten geçirilmiş, petrilere kapakları ise çok dikkatli açılmıştır. Regeneratların alınmasında kullanılan ince uçlu iğne, spatül vb. malzeme her defasında alkole sokulup alevde yakılmak suretiyle sterilize edilmiştir.



Tablo 1. Stok solusyon" MS "(MURASHIGE ve SKOOG, 1962)

GRUP 1	gr/500 cc saf su	Alınan Miktar
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82.5	10 cc
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	22.0	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	18.5	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.5	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.31	
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.115	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.43	
	cc/1500 cc saf su	
KI (0.415 gr/100 cc)	10	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (0.125 gr/100 cc)	10	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (0.125 gr/100 cc)	1	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.125 gr/100 cc)	1	
GRUP 2	cc/1500 cc saf su	2.5 cc
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.57	
Na <sub>2</sub> EDTA	7.45	
GRUP 3	cc/1500 cc saf su	1.0 cc
Gliserin	0.2	
Nikotinik	0.05	
Pridoxin-HCl	0.05	
Thiamine-HCl	0.01	
Şeker	30	
Agar	6	

Tablo 2.Regenerasyon besi ortamı ("MS": MURASHIGE ve SKOOG ,1962)

MAKRO ELEMENTLER	TAM (MS) mg/lt	1/2 (MS) mg/lt
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	825
$\text{KNO}_3$	1900	950
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	220
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	185
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	85
$\text{Na}_2$	37.5	18.68
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	13.9
<u>MİKRO ELEMENTLER</u>		
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	3.1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	11.15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6	4.3
KI	0.86	0.43
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.125
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0125
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0125
<u>ORGANİK BİLEŞİKLER</u>		
Sucrose	30.000	30.000
Agar	10.000	10.000
Glycine	2	1
Inositol	100	50
Nikotinik Asit	0.5	0.25
Pridoksin - HCl	0.5	0.25
Thiamin - HCl	0.1	0.05



### 3.2.3. Fotoperyot Uygulaması

Gerek köklenmeyi teşvik etmek için gerekse kökleneç genç bitkiciklerin adaptasyon çalışmaları gereği, fotoperyot uygulaması için bölümümüz imkanı ile hazırlanan toplam 80 W'lık beyaz floresans lambalarla aydınlanan bir cam kabinde gerçekleştirilmiştir. Ancak aydınlık ve karanlık peryotların tamamı ile manuel olarak elle idare edilmiştir. Üç hafta süre ile 10 saat aydınlık 14 saat karanlık, bundan sonraki üç hafta süresince 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık peryot uygulanmıştır.

### 3.2.4. Genç Bitkiciklerin Saksılara Alınmaları

Kavanozlar içinde yeteri kadar köklenen ve fotoperyot ile adaptasyona tabii tutulan bitkiciklerin her biri 8-10 cm. çapında ve 8-10 cm derinliğinde toprak deney saksılarına aktarılmışlardır.

Ancak bitkicikler aktarılmadan önce saksılar ve içine konulacak toprak 160 - 180°C'oe 3 saat süre ile kuru havalı fırında sterilize edilmişlerdir. Toprak % 50 ince kum (mil) ile % 50 perlit karışımı olarak hazırlanmıştır. Steril kabin içinde saksılara aktarılan bitkicikler, komple sıvı besi çözeltisi ile sulanmışlardır (Tablo 3).

Tablo 3 Komple sıvı besi çözeltisi

MAKRO ELEMENTLER	gr/1 lt saf su
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0.5
$\text{CaSO}_4$	0.5
$\text{MgSO}_4$	0.5
$\text{NaCl}$	0.5
$\text{KNO}_3$	0.5
$\text{FeCl}_3$	0.5
İZ ELEMENTLER	cc /1 lt saf su
$\text{NH}_4\text{MoO}_4$	1.0
$\text{CuCl}_2$	1.0
$\text{MnCl}_2$	1.0
$\text{Na}_2\text{BO}_3$	1.0
$\text{ZnCl}_2$	1.0

Steril toprak içine alınan bitkiciklerin hiç zedelenmeden alınan kökleri tamamı ile toprak içinde kalacak şekilde aktarılmıştır. Saksılanan bitkiciklerin her biri ayrı ayrı olmak üzere hava sızdırmayan birer naylon torba içine alınarak, bitkiciklerin bulunduğu mikroklimada havanın nisbi rutubetinin belli bir miktarda olması sağlanmış bitkicik yeni ortama adapte olduktan sonra, geliştikçe naylon torbadan çıkarılarak adaptasyon uygulamasına son verilmiştir.

Adaptasyon sağlandıktan sonra naylon torbası çıkarılan bitkilere yine steril suda erimiş halde N bakımından fakir kimyasal gübre ya da çok düşük konsantrasyonda tavuk veya kuş gübresi şerbeti verilerek bitkinin çiçeğe yatması sağlanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Materyalin Temini

Çalışmada kullanılan *Petunia x hybrida* eksplantlarının, serada yetiştirilen bitkilerden temin edilenleri doğrudan doğruya bahçede yetiştirilen bitkilerden temin edilenlere oranla daha sağlıklı sonuç verdiği doku kültürü çalışmaları esnasında saptanmış bulunmaktadır. Her ne kadar sera dışından temin edilenler üzerinde hiçbir kontaminasyon belirtisine rastlanmasa bile eksplantların in-vitro koşullarda gelişmeleri esnasında çok sayıda kontaminasyon bulgusu ortaya çıkmıştır. Ama serada yetiştirilen örnek bitkilerden alınan eksplantların diğerlerine oranla daha az kontaminasyonlu olmaları nedeniyle gelişmeleri daha sağlıklı olmuştur.

Meristem kültürü ile yeni bitkiciklerin elde edilmesinde genç bitkilerden alınan eksplantların veriminin yaşlı bitkilere oranla daha yüksek olduğu görülmüştür.

Donor bitkinin çiçeklenmesi engellendiği zaman daha uzun süreli eksplant alınımı sağlanmıştır.

### 4.2. Sterilizasyon

Besin ortamları ile manipilyonda kullanılan araç ve gereçlerin otoklavda 120°C'de 15 Lb basınç altında 20 dakika süre ile sterilize edilmeleri kuru fırınlarda 160°C'de bir saat tutularak yapılan sterilizasyona oranla daha sağlıklı sonuç vermiştir.

Köklenen genç bitkiciklerin saksılara alınması esnasında saksıların, saksılara konulan kum perlit karışımının sterilizasyonu için 160°C'de 1 saat kuru fırında tutularak sterilize edilmesinin kimyasal sterilizasyona hatta otoklav ile sterilizasyona oranla daha sağlıklı ve uygun olduğu görülmüştür.

#### 4.3. Besi Ortamları

Donor bitkilerden alınıp MS temel besiyerine (Tablo 1) ekilen eksplantlar bu besiyerinde 8-16 hafta süre canlılıklarını sürdürdükleri, ama belirgin bir kallus oluşumu ve vegetatif bir gelişim göstermedikleri saptanmıştır (Resim 2).

Temel besi ortamı olarak alınan MS besi ortamına daha sonra ayrı ayrı IAA 1,0 mg/lt, BA 1,0 mg/lt ve KIN 1,0 mg/lt ilave edilmiştir. KIN içeren besin ortamında eksplantları çok iyi bir vegetatif ile az bir kallus geliştirdikleri görülmüştür (Resim 3,4).



Resim 2. " MS" Temel besiyerine ekilen eksplantlar



Resim 3. 1,0 mg/lt KIN'lı "MS" Besiyerine ekilen eksplantların bir hafta sonraki görünümü.

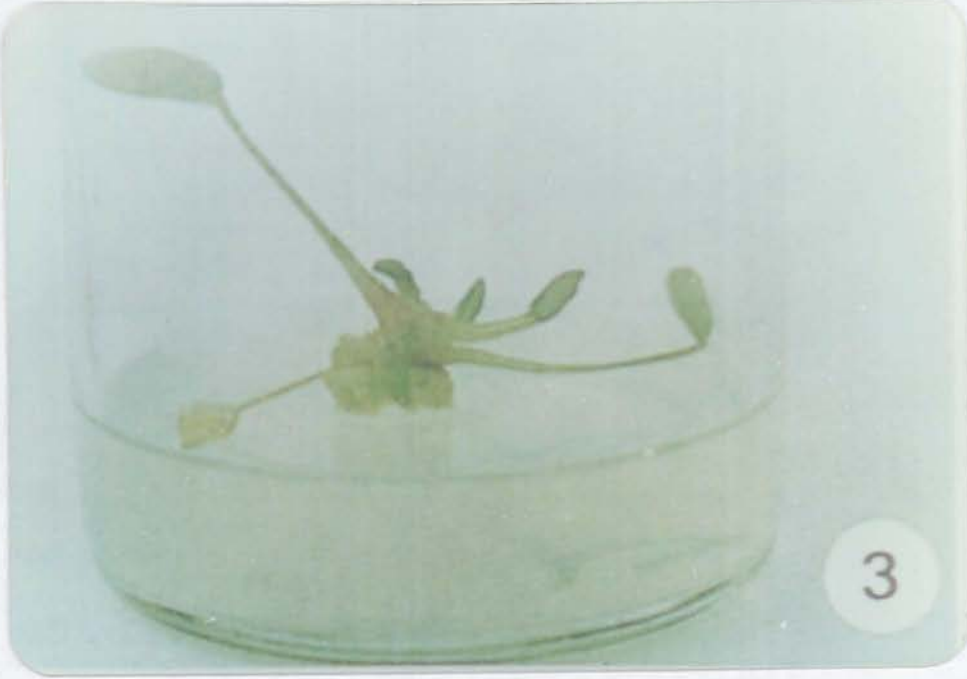


Resim 4 1,0 mg/lt KIN 'lı "MS"Besiyerine ekilen eksplantların iki hafta sonraki görünümü.

Kinetinli besi ortamında iki hafta süre ile vegetatif olarak gelişen ve az miktarda kallus oluşan eksplantlar içinde IAA (1,0 mg/l) ve BA (0,1 mg/l) bulunan MS besi ortamında, kavanozlar içinde, iyi bir vegetatif gelişim gösterdikleri saptanmıştır. Ancak köklendirme amacı ile bu besin ortamına alınan eksplantların yeteri kadar kök gelişimi sağlamadıkları görülmüştür (Resim 5,6).

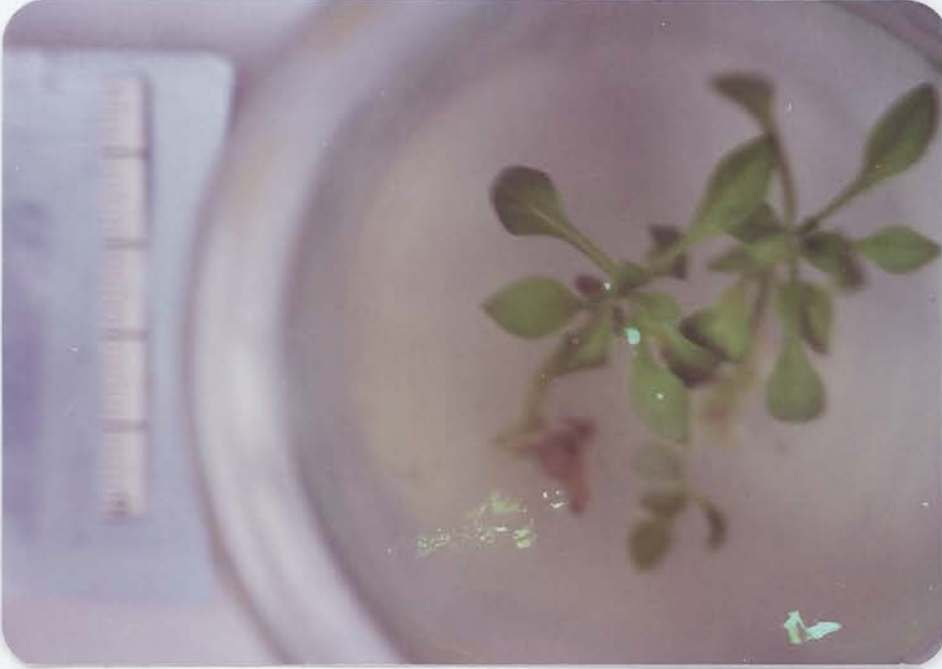


Resim 5: IAA (1,0 mg/l) ve BA (0,1 mg/l)'lı"MS" Besiyerine aktarılan eksplantların bir hafta sonraki görünümü



Resim 6: IAA (1,0 mg/lit) ve BA (0,1 mg/lit) 'I' MS' Besiyerindeki Eksplantların Üç Hafta Sonraki Görünümü.

İçinde  $GA_3$  (1,0 mg/lit) ve KIN (0,5mg/lit) bulunan MS besin ortamına aktarılan eksplantlarda üç hafta süre ile az da olsa bir kök gelişimi görülmüştür (Resim 7).



Resim 7:  $GA_3$  (1,0 mg/lit) ve KIN (0,5mg/lit)'I' MS' Besiyerine aktarılan eksplantların üç hafta sonraki görünümü.



Alınan eksplantların ilk olarak 1,0mg/lt KIN'lı "MS" besiyerli petrilere ekilmesinin kavanozlara ve deney tüplerine ekilenlere oranla daha sağlıklı sonuçlar verdiği anlaşılmıştır.

Ancak 1 cm büyüklüğe erişen eksplantların 1,0mg/lt IAA ve 0,1mg/lt BA'lı"MS"ve 1,0 mg/lt GA<sub>3</sub> ve 0,5 mg/lt KIN'lı "MS"besiyerli kavanozlarda iyi geliştikleri görülmüştür.

Kavanozlara aktarılan eksplantlara 20 W'lık dört adet floresans lamba ile aydınlatılan kabin içinde fotoperyot uygulanmıştır. Bunun için üç hafta süre ile önce 10 saat ışık 14 saat karanlık, daha sonra ise üç hafta boyunca 14 saat ışık 10 saat karanlık periyodu uygulanmıştır. Bu uygulamanın kavanoz içindeki bitkilerin vegetatif gelişmeleri üzerine çok iyi sonuçlar verdiği görülmüştür.

İyi bir vegetatif gelişme sağlanan ancak çok az köklendirilebilen eksplantlar daha önce de belirtildiği gibi içinde 1 kısım kum ve 1 kısım perlit bulunan saksılara alınmışlardır. Saksılar sterilize edilmiş komple sıvı besin çözeltisi ile bitkilerin istekleri doğrultusunda verilmiştir.

Kavanozlardan saksılara alınan bitkicikler önce bir şeffaf naylon torba içine alınarak mikroklima yaratılmıştır. Bu halde de üç hafta süre ile 10 saat ışık 14 saat karanlık yine diğer üç haftada da 14 saat ışık 10 saat karanlık fotoperyat uygulaması yapılmıştır.

Bu fotoperyot süresi içinde bitki normal koşullara adaptasyon sağlamıştır. Bundan sonra naylonlar çıkarılmıştır.

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada araştırma bitkisi olan *Petunia x hybrida*'nın aksillar ve apikal tomurcuklarından eksplantlar alınmıştır. İn-vitro koşullarda apikal tomurcuklardan alınan eksplantlar aksillar tomurcuklardan daha iyi sonuç vermiştir. HU ve WANG adlı araştırmacıların 1985 yılında otsu bir bitki olan *Solanum tuberosum* (patates) üzerinde yaptıkları meristem kültürü çalışmalarında bizim gibi alınan eksplantlardan alınan apikal tomurcukların, aksillar tomurcuklardan biraz daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. *Papulus nigra*, *Eucaliptus sp.*, *Araucaria sp.*, *Cryptomeria sp.*, *Tectona sp.*, *Thuja.*, *Malus sp.*, *Prunus sp.*, *Pyrus sp.*, *Ribes sp.*, *Rubus sp.*, bitkileri üzerinde CRESSWELL ve NITSCH (1975), GİLES ve WHITEHEAT (1977), AMOS (1979), EVANS (1981), GUPTA (1981), KARTHA (1981) gibi araştırmacılar bizden farklı olarak aksillar tomurcuklarla yaptıkları meristem kültürü çalışmalarında oldukça başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. 1980 yılında *Sassafras randaiense* gibi ağaçlarda yaptıkları meristem kültürü çalışmalarında HU ve WANG bizim gibi apikal tomurcukları kullanmışlardı. BROOME ve ZIMMERMAN (1980) adlı araştırmacıların elma DINKEL ve UNGELENK adlı araştırmacıların 1985'de *Betula pubescens*, *B. pendula* ve *Cerasus avium* ile 1986 yılında *Qercus robur*, *Q. petraea* bitkileri üzerinde yaptıkları meristem kültürü çalışmalarında aksillar tomurcuklardan eksplant olarak yararlanmışlardır. Bizim sonucumuzdan farklı olarak aksillar tomurcuklardan apikal

tomurcuklara oranla daha iyi kök gelişimi ve sürgün büyümesi görülen bitkiler elde etmişlerdir.

Genç *Petunia x hybrida* bitkilerinden elde edilen eksplantlardan gelişen bitkilerin yaşlı *Petunia x hybrida* bitkilerinden alınan eksplantlardan gelişen bitkilere oranla daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır. GILES ve WHITEHEAD (1977) adlı araştırmacıların *Pinus radiata* bitkileri üzerinde yaptıkları çalışmalarda, HU ve WANG (1985)'in *Solanum tuberosum* üzerinde yaptıkları meristem kültürü çalışmalarında genç bitkilerden alınan eksplantlardan gelişen bitkilerin daha sağlıklı olduğu sonucunu bulmuşlardır.

*Petunia x hybrida* bitkisinden gerek apikal gerekse aksillar tomurcuklardan alınan 0,1 mm büyüklüğündeki eksplantlar çok iyi sonuç vermiştir. Daha küçük eksplantların gelişiminin çok yavaş ve zor olduğu daha büyük eksplantlarda ise kontaminasyon olasılığının olduğu saptanmıştır. KERBOUY (1984)'de orkidelerden *Catasetum trulla* üzerinde yaptığı çalışmalarda 1 mm büyüklüğünde eksplantlarla başarılı olmuşlardır. Bu büyüklüklerin farklı olmasının objelerin genotipik özelliklerinin farklı olmasından ve deney koşullarından kaynaklandığı kanısındayız

Serada kontrollü şartlarda yetiştirilen donör bitkilerden elde edilen eksplantlar çok iyi sonuçlar vermiştir. Sera dışında bol gübreli ortamda yetiştirilen donör bitkilerinde ise bol miktarda tomurcuk sağlanabildiği halde bu bitkilerden alınan eksplantların çok çabuk kontamine oldukları görülmüştür.

Donor bitkilerden eksplantların çiçeklenmeden önce alınması başarı oranını arttırmıştır. Bu amaçla serada yetiştirilen bitkilerin çiçeğe yatmamaları sağlanmıştır.

Hormon ve vitaminlerin besiyerine katılmaları esnasında besiyeri ne çok soğuk ne de çok sıcak olmamalıdır. Besiyeri çok soğuk olduğu zaman ilave edilen vitamin ve hormonların besiyerine tam dağılmadığı ve hatta tam erimeğini yaptığımız çalışmalarda saptamış bulunuyoruz.Yine söz konusu maddelerin çok sıcak besiyerine katılmaları durumunda da özelliklerini kaybettikleri için sonucun pek iyi olduğu söylenemez.Bu nedenle vitaminler ve hormonlar sterilize edilen besiyeri 40°C'ye kadar soğutulduktan sonra eklenmişlerdir. Bu besiyerinde de verimin diğerlerine oranla daha verimli olduğu saptanmıştır.

Petunia x hybrida bitkisinin eksplantları KIN (1,0 mg/lit)'lı "MS" besin ortamında diğer ortamlara oranla daha iyi kallus oluşturmuşlardır.Kallus oluşumundan sonra eksplantlar IAA (1,0 mg/lit) ve BA (0,1 mg/lit) lı "MS" besiyerinde denenen diğer ortamlara oranla daha iyi vegetatif gelişim gösterdikleri ve sürgün büyümesinin iyi olduğu saptanmıştır. HU ve WANG (1985) Solanum tuberosum üzerinde yapmış oldukları meristem kültürü çalışmalarında yine temel besi ortamı olarak MS besiyerini kullanmışlardır. Ancak yapmış oldukları çalışmada sukroz (0,23 gr/lit) ve BA (22,0-44,0 mg/lit) yı MS besi ortamına eklemişlerdir. Bu besi ortamının sürgün gelişimi ve vegetatif gelişim için en uygun olduğunu saptamışlardır.

Petunia x hybrida'nın vegetatif gelişim gösteren sürgünleri köklendirmek için MS besi ortamına bir çok hormon ve vitamin katılarak denenmiştir. Ancak en sağlıklı köklenmenin GA<sub>3</sub> (1,0mg/lit) ve KIN (0,5mg/lit) 'lı"MS"besiyerinde olduğu

görülmüştür. HU ve WANG, 1980 yılında 5 yaşındaki Sassafras randaiense ağaçları ile yaptıkları meristem kültürü çalışmalarında ise LS (LINSMAIER ve SKOOG, 1965) besin ortamını kullanmışlardır. Sürgün gelişmesi için 1,5 besin ortamına NAA (0,27 mg/lit) ve KIN (0,28 mg/lit) kullanmışlardır. Kök gelişmesi için sürgün gelişmesi tamamlandıktan sonra LS temel besi ortamına IBA (25,0 mg/lit) ekledikleri ortamdan en sağlıklı sonucu almışlardır.

Petunia x hybrida üzerinde yapılan meristem kültürü çalışmalarında eksplantlardan elde edilen sürgünler kavanozlara alınarak çeşitli sürelerde fotoperiyot uygulanmıştır. Ancak en sağlıklı gelişim farklılaşma ve köklenmenin 10 saat karanlık 14 saat ışık uygulaması olduğu anlaşılmıştır. KERBOUY (1984)un orkidelerle (Catasetum) yapmış olduğu meristem kültürü çalışmaları esnasında benzer bir duruma rastlamıştır. KERBOUY (1984) araştırmasında 8 saat karanlık ve 16 saat ışıklı bir periyot uygulamıştır. HU ve WANG (1985) gerek patatesler gerekse Sassafras randaiense gibi ağaçlar üzerinde yapmış oldukları meristem kültürü çalışmalarında gelişen sürgünlere 12 saat karanlık 12 saat ışık uygulamasının çok iyi sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

**KAYNAKÇA**

- Amos R., : 1979 Initial Trials With Commercial Micro Propagation of Birch Selections. Proc. Int. Plant. Prop. Soc. 29:387-393.
- Berbee J.G. and Lester D.T., 1977, Within Clone Variation Among Black Paplar Trees Derived Fram Callus Culture For Sci 23:122-131.
- Broome, O.C. and Zimmerman, R.H. (1980a). Micropropagation of Thomless Blackbery, U.S. Dep., Agric., Sci.Edu. Admin ARR-NE-11, 23-27.
- Broome, O.C. and Zimmerman, R.H. (1980 b). Blueberry Micropropagation, U.S., Dep., Agric., Sci. Educ. Admin ARR-NE-11, 44-47
- Broome O.C. and Zimmerman, R.H. (1980c). Aple Cultivar Micropropagation U.S. Dep. Agric., Sci Educ. Admin ARR-Ne-11, 54-58.
- Bokelman, G.S., and Roest S. (1983). Plant regenerationion From Protoplasts of Potato. Z. Pflanzenphysiol. 109: 256-265.

- Cresswell, R. and Nitsch, C. 1975. Organ Culture of *Eucalyptus Grandis*. *Planta* 125:87-90.
- Dinkel A. Meier-Ungelenk, B. 1985 in-vitro Propagation of Hairy Birch (*Betula Pubescens*) and European White Birch (*Betula Pendula*) Lower Saxony, Forest Research Institute. Dept of Forest Tree Breeding D 3513 Stavfenberg-Enscherade, W. Germany.
- Dinkel A. Meier-Ungelenk. B. 1985 in-vitro Propagation of Mazarel (*PRunus Avism*) Lower Saxony Forest Research Instiwiwe Dept of Forest Tree breediye D-3513 Stavfenbery-Enscherode, W. Germany.
- Dinkel A. Meier-Ungelenk.B. 1986 in-vitro Vermehrung Von Stieleiche (*Quercus robur*) und Travbeneiche Forstliche Versuchsanstalt. Abt Forstpflanzenzuchng 3513 Staufenber-Escherode.
- Engin Gönül : Ocak 1992 *Triticum Aestivum* L. (Buğday) üzerinde anter kültürü çalışmaları Yüksek Lisans Tezi.
- Evans, D.A. : 1981. Soybean Tissue Culture. *Soybean Genetics Newsletter* 8:27-29.
- Gambarg O.L., 1968. Culture Methods and Detection of Glucanases in Suspansion Cultures of Wheat and Barley *Can J. Brochem* 46:417-421.

- Hildebrandt A.C. and Schenk R.V., 1972. Medium and Techniques for Induction and growth of Monocotyledonous and Dicotyle Donous Plant Cell Cultures. Can J.Bot. 50:199-204.
- Hu, C.Y. : 1979, Propagation of *Sassafras Radaiense* (hay.) Rehd Taiwan for J.5:30-31 (In Chinese).
- Hu, C.Y. and Wang P.J. 1985 Potato Tissue Culture and its Applications in Agriculture Ace damic Press Inc., Chapter 15, s.504-559.
- Hu, C.Y. and Wang P.J. 1980 Regeneration of virüs-free Plants Through in-vitro Culture. In: Advances in Biochemical Engineering, Vol 18 Plant Cell Cultures II (A. Fiecter ed) pp.61-99, Springer- Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Kartha, K.K. :1981 Meristem Culture and Cryopreservation Methods and Application. In Plant Tissue Culture PP. 181-211. Academic Press New York.
- Kaya Zeki : Mayıs 1988 Doku Kültürünün Orman Ağaçları Islah Çalışmalarındaki Yeri Orman mühendisliği Dergisi, Sayı 5, sayfa 12-14-15-19.
- Knudson L., : 1946, Am Orchid Soc Bull 15, 214-217.



- Linsmaier E. m. and Skoog F., 1965. Organic Growth Factor Requirement of Tobacco Tissue Culture Physiol 18: 10-127.
- Morel G. : 1960 Producing virüs-free Cymbidums Am. Orchid Soc Bull, 29.
- Önder Nurten : 1985 Genel Bitki Fizyolojisi s.122.
- Şimşek Yaşar : 1989 Vegetatif Üretimdeki Son Gelişmeler ve Doku Kültürü Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları Dergi Serisi Cilt 35, sayı 1, No.69, sayfa 38-45.
- White P.R. 1932 Plant Tissue Cultures Apreliminary Report of Result Obtained in the Culturnig of Cetain Plant Meristems Arch. Exp. Zelforschung 12.
- Yentür Semahat : 1984, Bitki Anotomisi sayfa 50-54,313-314.